

| | |
|---------|--|
| 称号及び氏名 | 博士（工学） 三ツ井 良輔 |
| 学位授与の日付 | 令和 3 年 3 月 31 日 |
| 論文名 | 「Development and Application of Novel Methods for Modification of Yeast Phenotypes Using CRISPR-Cas System (CRISPR-Cas を利用した新規酵母表現型 改変手法の開発とその応用)」 |
| 論文審査委員 | 主査 荻野 博康 副査 武藤 明德 副査 安田 昌弘 副査 山田 亮祐 |

論文要旨

バイオプロセスは低環境負荷であり、持続可能な社会の実現のための有望な選択肢である。優れた発酵特性を有する組換え微生物を構築する技術は、組換え微生物を用いた高効率な有用物質生産の達成に重要である。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は安全であり、比較的増殖が早いなど、宿主としての様々な利点を有する。特に、ゲノム DNA の相同組換え (HR) 効率が高く、遺伝子の挿入や破壊のような遺伝子組換えが簡便である。

遺伝子の発現量を操作して細胞内の代謝反応を改変することで、特定の物質の生産に特化した組換え微生物を作製することが可能である。しかし、代謝反応の最適化には複数の遺伝子の過剰発現や破壊が必要であり、最適な代謝経路を構築することは容易ではない。

δ -インテグレーション法は、HR を利用して酵母ゲノム DNA にある δ 配列座に DNA 断片を挿入する手法である。 δ 配列は酵母ゲノム DNA に広く分布しており、同手法は複数の DNA 断片を 1 度に挿入することができる。これまでに、 δ -インテグレーション法を用いて様々な遺伝子を挿入して優れた組換え酵母株を構築するカクテル δ -インテグレーション法が開発されたが、物質生産への応用はなされていない。

酵母 *S. cerevisiae* は中温菌であり、30°C 付近で良好に増殖する。酵母を用いた大規模な発酵工程では、発酵熱による増殖阻害を防ぐために絶えず発酵槽の温度制御を行う必要がある。熱以外に、酸や有機溶媒、浸透圧等も発酵効率を低下させるストレスとなる。そこでゲノム DNA へ変異を導入し、ストレス耐性酵母を作製する試みがなされてきた。しかし、紫外線や変異薬剤による従来の点変異導入法では遺伝子発現量の変化が期待できないうえ、必須遺伝子の欠失が問題となる。したがって、簡便で低致死率、かつ大規模な変異を導入できる新たな手法の開発が求められている。

本研究は、酵母表現型を改変する新規手法の開発と有用物質生産に適した組換え酵母株の構築を目的とした。具体的には CRISPR-Cas とカクテル δ -インテグレーション法を用いて、酵母のストレス耐性、発酵能力、もしくはその両方の向上を検討したものであり、以下に示す 5 つの章から構成される。

第 I 章では本研究の研究背景、目的、および構成を述べた。

第 II 章では、CRISPR-Cas を用いて酵母のゲノム DNA を組換える新規の手法「ゲノム進化法」を開発した。この手法は CRISPR-Cas で δ 配列を切断することで、DNA 修復の際に大規模な変異を誘発させることが可能である。この手法を 37°C-39°C の温度範囲で酵母細胞に適用し、スクリーニングにより 39°C で増殖が可能な熱耐性酵母株 T8-292 を取得することに成功した。また、この株は低 pH、高エタノール濃度でも高い細胞生存率を示した。さらに、RAPD PCR 法により、変異株と元株のゲノム DNA に違いがあることが示唆された。私が本研究で開発したゲノム進化法は、酵母の様々なストレス耐性を改善するための有望な手法となり得る。

第 III 章では、先行研究で糖高速消費株の構築に有効であったカクテル δ -インテグレーション法を種々の物質生産に応用した。

第 III 章 1 節では、酵母による効率的な D-乳酸生産を実現するために、カクテル δ -インテグレーション法により 1 度に複数の代謝遺伝子の発現を改変するグローバル代謝工学戦略 (Global metabolic engineering strategy, GMES) を用いた。具体的には 12 種類の解糖関連遺伝子と *Leuconostoc mesenteroides* 由来の D-LDH 遺伝子の発現を改変し、スクリーニングにより酵母株 YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18 を取得した。そして 40 g/L CaCO₃ を中和剤として培地に添加し、YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18 用いて 10 回の繰り返し回分発酵を行い、安定した D-乳酸生産を達成した。10 回の繰り返し回分発酵による平均 D-乳酸生産量、生産速度、収率は、それぞれ 60.3 g/L、2.80 g/L/h、0.646 g/g-glucose であり、特に生産速度は既往の研究と比較して非常に高速であった。

第 III 章 2 節では、2,3-ブタンジオール (2,3-BDO) 生産酵母を作製するために、カクテル δ -インテグレーション法を用いて α -アセト乳酸合成酵素、 α -アセト乳酸脱炭酸酵素、2,3-BDO 脱水素酵素、および NADH 酸化酵素をコードする 4 つの遺伝子の発現を調節した。得られた株 YPH499/dPdAdG/BD6-10 を用いて流加培養を行ったところ、2,3-BDO の生産量、生産速度、収率はそれぞれ 80.0 g/L、4.00 g/L/h、0.417 g/g-glucose であった。本節で作製した株が示した 2,3-BDO の生産速度および収率は、これまでに発表された組換え酵母の報告と比較して最も高い値であった。

第 III 章 3 節では、GMES を用いて、8 種類のメバロン酸経路の遺伝子と *Pogostemon cablin* 由来のパチョロール合成酵素遺伝子の発現を改変した。得られた株 YPH499/PAT167/MVA442 は、パチョロール生産量 42.1 mg/L、生産速度 0.351 mg/L/h、収量 2.05 mg/g-glucose を示した。これらの生産量、生産速度、収率は、これまでに報告されている組換え微生物の研究と比較

しても高水準であった。GMES は反応が多段階に及ぶ種々の有用物質生産経路の改善に有効であることが示唆された。

第 IV 章では、DNA 断片の組換え効率の向上を期待して、第 II 章で構築した CRISPR-Cas と δ -インテグレーション法を組み合わせた CRISPR- δ -インテグレーション法を試みた。

第 IV 章 1 節では、酵母における効率的な組換えタンパク質生産技術を確立するために、組換えタンパク質エンドグルカナーゼ II (TrEG) の分泌生産を検討した。具体的には、CRISPR- δ -インテグレーション法および、様々なプロモーターで TrEG を発現するマルチプルプロモーターシャッフリング法を検討した。その結果、CRISPR- δ -インテグレーション法は TrEG のコピー数の増加に有効であった。酵母ゲノム DNA に挿入された TrEG のコピー数は、従来の δ -インテグレーションでは 14 コピーであったのに対し、CRISPR- δ -インテグレーションでは 40 コピーに達した。マルチプルプロモーターシャッフリング法は TrEG の転写量の向上に有効であった。さらに、CRISPR- δ -インテグレーション法とマルチプルプロモーターシャッフリング法を組み合わせる方法で構築した TrEG 発現株 YPH499/24CP の CMC 分解活性は 559 U/L に達し、従来の YEp 型ベクターで構築した株の 17.3 倍であった。全体として、CRISPR- δ -インテグレーションとマルチプルプロモーターシャッフリングの同時使用は有用であり、組換えタンパク質高生産に容易に適用できることが示唆された。

第 IV 章 2 節では、D-乳酸生産における中和剤量を低減するために、D-乳酸生産乳酸耐性酵母の構築を目指した。まず、第 II 章で述べたゲノム進化法により酵母の低 pH 耐性を改善した後、乳酸耐性の改善を行った。乳酸ストレス下でゲノム進化を行う前に低 pH 耐性を改善した株は、乳酸耐性のみを改善した株よりも高い乳酸耐性を示す傾向にあり、低 pH ストレスと乳酸ストレスへの応答の共通メカニズムが改善されたことが示唆された。得られた pHLA2-51 株は、親株が増殖不可能な 60 g/L 乳酸 (pH 2.6) の存在下で増殖した。また、トランスクリプトーム解析により、pHLA2-51 株では ATP 合成や酸化ストレスに関与する遺伝子の発現が増加していることが明らかとなった。続いて第 III 章で述べた GMES と、CRISPR-Cas を組み合わせる新規代謝改変戦略 GMES/CRISPR を pHLA2-51 株に適用して、解糖系と D-乳酸合成経路に関連する酵素遺伝子の発現を改変し、D-乳酸産生乳酸耐性酵母を構築した。取得した δ pHLA2-51/dP36 株は、100 g/L グルコースから非中和条件で 33.9 g/L の D-乳酸を、20 g/L CaCO₃ を培地に添加した半中和条件で 52.2g/L の D-乳酸をそれぞれ生産した。非中和条件での生産量はまだ工業生産の水準には達していないが、さらなる遺伝子破壊、培養条件の最適化、ゲノム進化法と GMES/CRISPR の反復適用により改善する可能性がある。

第 V 章では、各章の研究成果をまとめ、総括を述べた。本論文では、新規に開発したゲノム進化法によって酵母の熱耐性と乳酸耐性をそれぞれ向上させることに成功した。また、 δ -インテグレーション法や CRISPR- δ -インテグレーション法を駆使し、D-乳酸、2,3-BDO、パチヨロール、TrEG をそれぞれ高生産する酵母の構築に成功した。ゲノム進化法と GMES/CRISPR はともに δ 配列を切断する CRISPR-Cas を軸としており、ストレス耐性向上から代謝改変まで迅速な組換え株の構築が可能であることが示唆された。これらの手法は、ストレスの種類や代謝産物に関係なく適用することができ、今後の有用物質生産のための組換え酵母の構築への利用が期待できる。

審査結果の要旨

論文は、有用物質生産のための組換え酵母の表現型改変手法の開発、ならびに有用物質生産酵母の作製を目的として、出芽酵母のゲノム DNA への変異導入方法、および有用物質生産に関与する多段階の代謝経路の改変について研究したものであり、以下の成果を得ている。

(1) CRISPR-Cas を用いて酵母のゲノム DNA を組換える新規の手法を開発した。この手法を利用して、39°C で増殖が可能な熱耐性酵母株の取得に成功した。得られた熱耐性酵母株は低 pH、高エタノール濃度でも高い細胞生存率を示した。また、熱耐性酵母株はゲノム DNA が組換えられ、酵母の様々なストレス耐性を改善するための有望な手法となることが示唆された。

(2) カクテル δ -インテグレーション法により 1 度に複数の代謝遺伝子の発現を改変する方法により、D-乳酸、2,3-ブタンジオール、およびパチョロールを生産する酵母の構築に成功した。D-乳酸生産酵母は 10 回の繰り返し回分発酵において、既往の研究と比較して非常に高い D-乳酸生産速度を達成した。2,3-ブタンジオール生産酵母は流加培養において、既存の組換え酵母の中で最も高い生産速度と収率を達成した。パチョロール生産酵母は、回分培養において既存の組換え微生物と比較しても高いパチョロール生産量や生産速度を達成した。

(3) CRISPR と δ -インテグレーション法を組み合わせた方法、および、マルチプルプロモーターシャッフリング法により、単位培養上清当たりのエンドグルカナーゼ活性を向上させることに成功した。また、高濃度の乳酸存在下、D-乳酸を生産する酵母の作製に成功した。

以上成果は、CRISPR-Cas とカクテル δ -インテグレーション法などの方法を組み合わせることにより、酵母の新規なゲノム改変法を開発し、開発した改変法により、種々の有用物質生産や酵母のストレス耐性の向上が可能であることを示した。これは、生物を用いた物質生産技術の向上に寄与するものであり、化学工学分野の学術的、産業的な発展に貢献する可能性が高い。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。